

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Lucie Slovák

Úloha morfogenů při neurogení diferenciaci kmenových buněk u savců

The role of morphogenes in stem cell neurogenic differentiation in mammals

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Tereza Tlapáková, PhD.

Praha, 2018

Prohlašuji, že jsem tuto práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla veškeré použité zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu

V Praze, 15.5.2018

.....

Lucie Slovákova

Tímto bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Tereze Tlapákové, PhD. za její vedení a cenné rady při zpracování této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své sestře Karolíně, příteli Matoušovi a celé rodině za jejich nekonečnou trpělivost, energii a hlavně podporu, kterou mě neustále zásobují.

Abstrakt

Kmenové buňky jsou nediferenciované sebeobnovující populace buněk schopné dle svého diferenciačního potenciálu generovat více typů buněk. Při neurogenní diferenciaci dochází k produkci tří typů buněk nervové soustavy. K neurogenezi dochází během vývoje embrya, ale pokračuje i v některých oblastech dospělého mozku. Tyto oblasti se nazývají niche kmenových buněk a nachází se v subventrikulární zóně předního mozku a v subgranulární zóně gyrus dentatus v oblasti hipokampu. Morfogeny jsou signální molekuly přítomné v těchto niche a mají za úkol regulovat aktivitu neurálních kmenových buněk. Ovlivňují proliferaci, diferenciaci i migraci buněk a determinují tak osud nových neuronů. Mimoto mají důležitou roli i v řadě onemocnění a tumorigenezi.

Klíčová slova: neurální kmenové buňky, adultní neurogeneze, diferenciacie, morfogon, sonic hedgehog

Abstract

Stem cells are non-differentiated self-renewing cell population that can derive different kinds of cell types according to their differential potential. Neurogenic differentiation is the process of generating of all three types of nervous systems from the neural stem cells. This process is common for embryonic development, however neurogenesis appears to be present also in adult mammalian brain. It continues to generate new neurons within its microenvironments called niches and we can find two major areas of neurogenesis. One is the subventricular zone of the forebrain, the other is the subgranular zone within the hippocampal dentel gyrus. In these niches we can find specific signaling molecules called morphogens. Morphogens function in regulating neural stem cell activity. They play a part in proliferation, differentiation and cell migration, thus determining the fate of neural cells. In addition, morphogens play an important role in many diseases and cancers.

Key words: neural stem cells, adult neurogenesis, differentiation, morphogenes, sonic hedgehog

Seznam použitých zkratek

β TrCP – z anglického *β -transducin repeat-containing protein*

APC – z anglického *Adenomatous polyposis coli*

ASCs – *Adult stem cells* – dospělé kmenové buňky

BMP – *Bone morphogenetic protein* – kostní morfogenetický protein

cAMP – *Cyclic adenosine monophosphate* – cyklický adenosin monofosfát

CC – *Corpus Callosum* – vazník

CK1 – *Casein kinase 1* – kasein kináza 1

Dhh – *Desert hedgehog*

Disp – *Dispatched*

Dkk1 – *Dickkopf-1*

ESCs – *Embryonic stem cells* – embryonální kmenové buňky

hESCs – *Human embryonic stem cells* – lidské embryonální kmenové buňky

GD – *Gyrus dentatus*

GFAP – Gliální fibrilární acidický protein

GPCR – *G protein-coupled receptors* –receptor spřažený s G-proteinem

GSK-3 β – z anglického *Glycogen Synthase Kinase-3 β*

GPR161 – *G Protein-Coupled Receptor 161* – G-protein spřažený receptor 161

Hh – *Hedgehog*

HLA – z anglického *Human leucocyte antigen*

ICM – *Inner cell mass* – vnitřní buněčná masa

Ihh – *Indian hedgehog*

IFT – Intraflagelární transport

IPC – *intermediate progenitor cell* – Intermediární progenitorová buňka

iPSC – *Induced pluripotent stem cell* – indukovaná kmenová buňka

KIF7 – z anglického *Kinesin-4 family protein*

klf4 – z anglického *Kruppel-like factor 4*

LRP – z anglického *Lipoprotein receptor-related protein*

NCS – *Neural stem cell* – neurální kmenová buňka

NPC – Neurální progenitorová buňka

Oct3/4 – z anglického *Octamer-binding transcription factor 4*

PKA – Protein kináza A

Ptch – *Patched*

SC – *Stem cell* – kmenová buňka

sFRP3 – z anglického *Secreted Frizzled-Related Protein 3*

SGZ – Subgranulární zóna

Shh – *Sonic hedgehog*

Smo – *Smoothened*

Sox2 – SRY (z anglického *sex determining region Y*) -box 2

SSEA-3 – z anglického *Stage-Specific Embryonic Antigen-3*

SSEA-4 – z anglického *Stage-Specific Embryonic Antigen-4*

SuFu – *Suppressor of fused*

SVZ – Subventrikulární zóna

TAC – *Transient amplifying cell* – Tranzientně amplifikující buňka

TCF/LEF – z anglického *T-cell factor/lymphoid enhancer-binding factor*

TGF- β – *Transforming growth factor β* – Transformující růstový faktor β

TRA-1-60 – z anglického *Tumor Rejection Antigen*

Wnt/PCP – *Wnt planar cell polarity* – Wnt signalizace planární polarity buněk

Obsah

1. Úvod.....	9
2. Kmenové buňky	10
2.1. Embryonální kmenové buňky	11
2.2 Indukované kmenové buňky	11
2.3. Somatické kmenové buňky	12
3. Neurální kmenové buňky	13
4. Morfogeny neurogení diferenciací	15
4.1. Notch	16
4.2. BMP	16
4.3. Wnt.....	17
4.4. Sonic hedgehog	19
4.4.1 Funkce Shh	21
4.4.2 Shh signalizace a primární cilium	22
4.4.3 Shh signalizace a tumorigeneze.....	23
5. Závěr	24
Seznam použité literatury	25

1. Úvod

Do 60. let 20. století bylo považována neurogeneze v dospělém jedinci neprobíhá a je ukončena s embryonálním vývojem. Nicméně s objevem dvou oblastí mozku, ve kterých se vyskytují dospělé neurální buňky, se postupem času změnilo i toto paradigma a díky potvrzení, že tyto oblasti lze nalézt i u člověka, je nyní neurogeneze atraktivním tématem na poli vědeckého zkoumání a důvodů je hned několik. Hlavní motivací je využití NSC pro léčbu nebo zlepšení stavu lidí s neurodegenerativním onemocněním jako je Parkinsonova choroba, roztroušená skleróza, Huntingtonova choroba nebo mrtvice. Navíc NSC mají výjimečnou vlastnost migrovat tělem a usídlvat se v různých typech nádorů, to může být využito pro transport chemoterapeutik na místo účinku. Kmenové buňky by mohly být užitečným nástrojem pro sledování etiologie nemocí a pro vývoj léků.

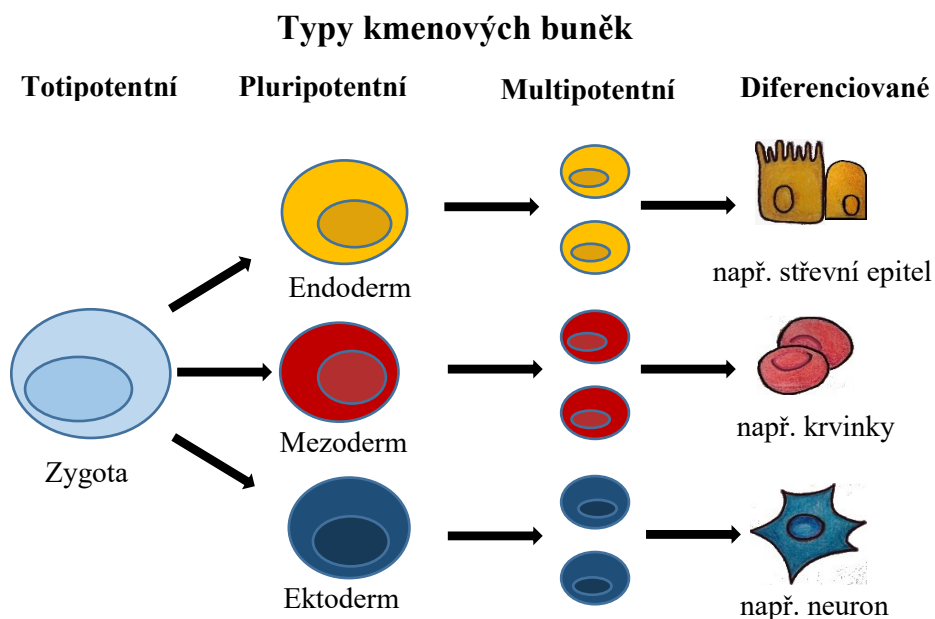
Nicméně pro možné využití neurálních i jiných kmenových buněk je potřeba nejdříve lépe porozumět mechanismům regulace, proliferace a diferenciaci buněk. K tomuto neodmyslitelně patří i pochopení funkce a dynamiky prostředí kmenových buněk, které je zásadním způsobem ovlivňuje. Toto prostředí je schopno reagovat na změny vnitřního i vnějšího charakteru a zahrnuje celou řadu růstových a neurotrofních faktorů, neurotransmiterů, buněčných a mezibuněčných signalizací, epigenetických modulátorů. Mezi tyto mechanismy komunikace určitě zásadním podílem přispívají i morfogeny. Pochopení působení těchto signálních molekul a pochopení kaskád, které spouštějí, by mohlo významně přispět k rozklíčování takového velkého a populárního tématu, jakým je neurogeneze. Navíc morfogeny často hrají roli při tumorigenezi. Nádory mozku jsou jedním z nejčastějších typů rakoviny. Studování morfogenů a jejich působení na buňky by mohlo přinést nový terapeutický nástroj.

Cílem této práce je formou literární rešerše přiblížit problematiku neurogeneze a naznačit působení nejvýznamnějších morfogenů. Tato práce se pak detailněji jedním z nich zabývá, a to ligandem Sonic hedgehog, který má významnou roli při vývoji nervové soustavy z pohledu dorzoventrálního uspořádání a jeho role je spjata i s dospělou neurogenézí.

2. Kmenové buňky

Kmenová buňka (SC) je nediferenciovaná buňka se schopností sebeobnovy (self-renewal). Tato vlastnost umožňuje buňce dávat vzniknout novým SCs, které jsou identické s mateřskou buňkou (symetrické dělení). Další vlastností SC je možnost diferenciovat se do mnoha různých buněčných typů, které spolu vytváří celý organismus. Během diferenciaci kmenové buňky často využívají asymetrického dělení, při kterém dochází ke vzniku dvou dceřiných buněk, kdy jedna z nich je diferenciovaná, druhá si pak zachovává kmenovost (Beckmann *et al.*, 2007). Podle potenciálu diferenciaci rozlišujeme SCs na totipotentní, pluripotentní, multipotentní a unipotentní (viz Obr.1).

Totipotentními buňkami jsou zygota a rýhováním vzniklé blastomery, které další proliferací pokládají základ embryonální a extraembryonální linii tzn. z oplozeného vajíčka se během časného embryonálního vývoje diferencují buňky vnitřní buněčné masy (ICM) a trofoblastu (Ma Hongbao, 2012). Pluripotentní buňky vznikají z buněk totipotentních a jsou schopny dát vznik buňkám všech tří zárodečných listů (ektoderm, mezoderm, endoderm). Multipotentní SCs produkují více buněčných typů dané tkáně, příkladem mohou být mezenchymální kmenové buňky a hematopoetické kmenové buňky. Unipotentní, neboli progenitorové buňky, se pak diferencují pouze v jeden buněčný typ, příkladem mohou být zárodečné buňky, které se diferencují v samčí nebo samičí pohlavní buňky. Kmenové buňky dále můžeme dělit na embryonální, somatické a indukované.



Obr. 1: Dělení kmenových buněk podle schopnosti diferenciaci

2.1. Embryonální kmenové buňky

Embryonální kmenové buňky (ESCs) byly odvozeny z buněk ICM blastocysty. Jejich první izolace byla provedena z myšního embrya v roce 1981 (Evans a Kaufman, 1981; Martin 1981), následnou úspěšnou izolaci linií lidských ESCs (hESCs) uskutečnili v roce 1998 Thomson a jeho tým z embryí vzniklých *in vitro* fertilizací. Tyto buňky mají standardní XX karyotyp, vysoký poměr obsahu jádra vůči cytoplazmě, exprimují povrchové molekuly SSEA-3 (Stage-Specific Embryonic Antigen), SSEA-4, TRA-1-60 (Tumor Rejection Antigen), TRA-1-81 a alkalickou fosfatázu. Také oproti somatickým buňkám vykazují vyšší telomerázovou aktivitu (Thomson *et al.*, 1998). Telomerázy hrají roli při zachování délek telomer na koncích chromozomů, což souvisí s životností buněk a se schopností neomezeného dělení (Bodnar *et al.*, 1998). ESCs si i po dlouhodobé manipulaci *in vitro* zachovávají stabilní karyotyp a pluripotenci (Thomson *et al.*, 1998).

V rámci dalšího embryonálního vývoje z nich vznikají buněčné typy tří zárodečných vrstev, včetně zárodečné linie. Tyto vrstvy slouží během vývoje jako zdroje všech somatických buněk těla. Po injekci ES buněk do imunodeficientních myší vytvářejí teratomy, což potvrzuje jejich pluripotenci (Martin, 1981). Díky výjimečným vlastnostem, kterými ESC disponují, je jejich využití příhodné pro buněčné terapie, regeneraci tkání, či etiologii lidských nemocí. Nicméně jejich použití se stále potýká s etickými i metodickými potížemi např. imunitní odpověď pacienta po transplantaci štěpu a jeho následné odhojení, nebo potenciální tvorba nádorů.

2.2 Indukované kmenové buňky

Diferenciované buňky je možné reprogramovat do stavu podobného ESC, tyto buňky byly nazvány indukovanými kmenovými buňkami (iPSCs) a poprvé byly vytvořeny z diferencovaných myších fibroblastů v roce 2006 laboratoří K.Takahashiho a S. Yamanaky v Kyotu. iPSCs vykazují stejnou morfologii a exprimují tytéž markery jako ESC, také se po jejich transplantaci do imunosupresivní myši tvoří teratomy. Navrácení dospělých somatických buněk do pluripotentního stavu bylo provedeno vnesením 4 transkripčních faktorů: Oct3/4, Sox2, c-Myc, klf4 pomocí retrovirového vektoru (Takahashi a Yamanaka, 2006).

Právě iPSCs představují možné řešení, co se týče etických problémů s embryonálními kmenovými buňkami, a jsou vhodnější i pro transplantace, protože jsou připravovány přímo z dospělých somatických buněk daného pacienta. Jejich potenciál byl již využit na myším modelu pro léčbu srpkovité anémie (Hanna *et al.*, 2007), či pro terapii míšního poranění (Tsuiji *et al.*, 2010). Nicméně přes všechny benefity, které iPSCs skýtají, bude jejich použití v klinické praxi ještě nějaký čas trvat a o nákladech za tuto individuální léčbu nemluvě.

2.3. Somatické kmenové buňky

Dospělé neboli adultní kmenové buňky (ASCs) představují typ kmenových buněk nacházející se u dospělého jedince v téměř každé tkáni. Jejich funkcí je udržování homeostázy dané tkáně tím, že nahrazují staré nebo poškozené buňky v průběhu života. AS buňky mají schopnost sebeobnovy, jsou multipotentní nebo unipotentní, takže možnost diferenciaci je za standardních podmínek, na rozdíl od ESC, omezena na buněčné typy v rámci určité tkáně. Některé ASCs jsou schopné transdiferenciaci, což je vlastnost umožňující diferenciaci do buněk jiných tkání nebo dokonce do buněk mimo svou zárodečnou vrstvu (Phinney a Prockop, 2007).

Nejlépe prozkoumanými ASCs jsou hematopoetické kmenové buňky, které dávají vzniknout myeloidním a lymfoidním liniím. Dalším příkladem jsou mezenchymální kmenové buňky. Ty vytvářejí linie odvozené od mezodermy tj. osteoblasty, adipocyty a chondrocyty. Jiným příkladem mohou být pak kmenové buňky kůže, trávicího systému, kosterního svalstva, nervového systému aj.

Transplantace ASCs se již léta běžně využívají v klinické praxi např. pro léčbu poruch krvetvorby a imunity. Je však potřeba vybírat dárce, jehož HLA antigeny se shodují s pacientovými, což zužuje výběr dárců. Obvyklé místo izolace kmenových buněk je kostní dřeň. Možné jsou i další místa odběru např. tuková tkáň (Zuk *et al.*, 2002), pupeční šňůra a pupečnicková krev (Secco *et al.*, 2008).

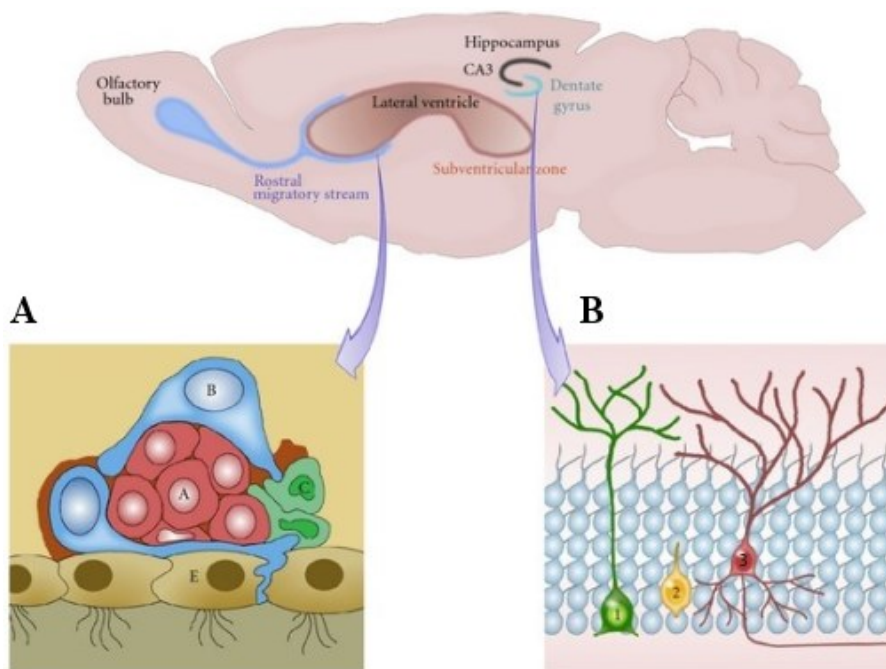
3. Neurální kmenové buňky

Neurální kmenové buňky (NSCs) jsou tkáňově specifické buňky schopné sebeobnovy a dávají vzniknout neurálním progenitorovým buňkám (NPCs), které se dále diferencují v buňky nervového systému. Jsou tripotentní, schopny generovat tři typy buněk: neurony, oligodendrocyty a astrocyty (Taupin a Gage, 2002). Tyto buňky jsou po většinu času udržovány v klidovém stavu, který je aktivně regulován (Shin *et al.*, 2015). V případě aktivace NS buňky využívají dva způsoby dělení, a to buď symetrické anebo asymetrické, přičemž asymetrické dělení převládá. Vznikají tak dvě rozdílné dceřiné buňky, čímž se produkují nové neurony, ale zároveň se udržuje pool NSCs. Marker NSC i NPC je nestin, což je protein intermediárních filament (Taupin a Gage, 2002), dalšími jsou např. Musashi1 (Kawase *et al.*, 2014), Sox1 (Venere *et al.*, 2012), Sox2 (Campbell *et al.*, 2015).

Dlouhou dobu se předpokládalo, že u dospělého savce již nevznikají žádné nové nervové buňky. Tento trend myšlení změnili v 60. letech Altman a Das, kteří poukázali na dvě hlavní oblasti hlodavčího mozku, ve kterých dochází k neurogenезi. Těmito oblastmi jsou subgranulární zóna (SGZ) *gyrus dentatus* (GD) v hipocampu (Altman a Das, 1965) a subventrikulární zóna (SVZ) ležící v bočních částech komor předního mozku (Altman 1969). Tyto oblasti neurogeneze se nazývají niche neurálních kmenových buněk a mají za úkol regulovat chování kmenových buněk. Obecně se jedná o specifické mikroprostředí okolo kmenových buněk, kde dochází k vzájemné dynamické interakci. Tyto interakce jsou klíčové pro udržení homeostázy dané tkáně.

SVZ je vrstva pomalu se dělících buněk oddělená od bočních komor vrstvou ependymálních buněk. Tyto dělící se buňky jsou astrocytární NSCs (také označované jako B buňky), vyznačují se expresí GFAP (gliální fibriální acidický protein). Z nich vznikají tranzientně amplifikující buňky (TACs, C buňky) vytvářející shluky. TACs jsou hojně proliferující progenitory, které diferencují v nezralé neuroblasty (A buňky), což jsou migrující buňky směřující ze SVZ rostrálním migračním proudem do čichového bulbu. Zde dozrávají v interneurony čichové dráhy (Doetsch *et al.*, 1999; Altman 1969) (viz Obr. 2). Dospělé astrocytární NSCs v SVZ slouží také jako primární progenitory pro nové oligodendrocyty, v porovnání s produkcí neuronů však v menší míře. Bylo také prokázáno, že SVZ-generované oligodendrocyty se při poškození dospělého mozku podílí na procesu remyelinizace (Menn *et al.*, 2006).

V SGZ hipocampu na hranici *hilu* a vrstvy granulárních buněk se nacházejí buňky typu 1 neboli radiálním gliím podobné NSCs, které také exprimují GFAP. Dále produkují intermediární progenitorové buňky (IPCs, buňky typu 2). Tyto buňky mají tranzientně amplifikující charakter a dávají dále vzniknout buňkám typu 3 - neuroblastům, které migrují pouze do vedlejší granulární vrstvy a diferencují se ve zralé granulární neurony (Seri *et al.*, 2001; Goncalves *et al.*, 2016) (viz Obr. 2).



Obr. 2: Dvě hlavní oblasti neurogeneze v dospělém mozku savce: Subventrikulární zóna (SVZ) a Subgranulární zóna *gyrus dentatus* (SGZ).

A) SVZ – Astrocytární NSCs (B) generující tranzientně se amplifikující buňky (C) dávající vzniknout migrujícím neuroblastům (A), ependymální buňky (E). **B)** SGZ – Radiální gliím-podobné NSCs (1) produkující intermediární progenitory (2), ze kterých vznikají nezralé neurony (3) (upraveno z Dias *et al.*, 2012).

Somatické kmenové buňky mají v těle většinou úlohu regenerace, někteří se však domnívají, že primární funkcí adultních NS buněk není doplňování a nahrazování starých nebo poškozených buněk, ale spíše skrze neurogenezi poskytovat mozku určitou plasticitu (*et al.*, 2014). Hipokampus má roli v procesu učení, paměti, řízení nálady, nově vzniklé neurony v GD se tedy zřejmě také podílejí na těchto funkcích a přispívají ke kognitivní přizpůsobivosti a separaci vzorců (Spalding *et al.*, 2013). Separace vzorců je proces důležitý

pro oddělení dvou podobných vstupů. Tyto vstupy mozek odděluje v čase i prostoru. Tuto funkci mají zřejmě i nové neurony v čichovém bulbu myši (Sahay *et al.*, 2011).

Neurogenезi je možné pozorovat i u člověka. Na konci 20. století vědci prokázali přítomnost neurogenезe v GD hipokampu u pacientů trpících rakovinou, a to pomocí látky bromodeoxyuridin (BrdU), která byla pacientům podávána. Tato látka, která se zabudovává do DNA během S fáze buněčného cyklu a následně může být imunohistochemicky detekována, je používána k označení proliferujících buněk (Eriksson *et al.*, 1998). U člověka, na rozdíl od hlodavců, byla pozorována jen minimální postnatální migrace neuroblastů ze SVZ do čichového laloku, ačkoli neurogenезe v SVZ člověka probíhá (Bergmann *et al.*, 2012). Vědci tedy předpokládali možné putování neuroblastů do jiných částí mozku poblíž SVZ, zjistili tak, že neuroblasty migrují do striata koncového mozku (Ernst *et al.*, 2014). Neurogenезe obecně s věkem klesá, nicméně porovnáme-li člověka s hlodavcem, pokles tvorby nových neuronů je u člověka vzhledem k věku mírnější než u myši (Spalding *et al.*, 2013).

4. Morfogeny neurogenní diferenciace

Již bylo zmíněno, že dospělé kmenové buňky obývají své niche a že toto velmi specifické mikroprostředí s buňkami komunikuje a aktivně je podle potřeby reguluje. Jedná se o komplex vnějších i vnitřních faktorů, mezibuněčných interakcí, růstových faktorů, signálních drah, které dynamicky řídí fungování tkáně. Nedílnou součástí tohoto celku jsou i morfogeny. Morfogeny jsou extracelulární signální molekuly produkované z přilehlého zdroje, ze kterého se šíří a vytvářejí koncentrační gradient. Působí na okolní reagující buňky a pomocí gradientu je informují o jejich pozici, nasednutím na receptor pak spouští signální dráhy, které v závěru indukují expresi cílových genů. Tak je určena další budoucnost buněk. Mají zásadní vliv na diferenciaci buněk během embryonálního vývoje jedince, ale jejich uplatnění přetrvává i do dospělosti. Signální dráhy se mohou křížit a svými produkty se často vzájemně ovlivňují. Nejvíce studovanými morfogeny při neurogenезi v dospělém savčím mozku jsou Notch, kostní morfogenetické proteiny (BMPs), Wnt a Sonic Hedgehog (Shh).

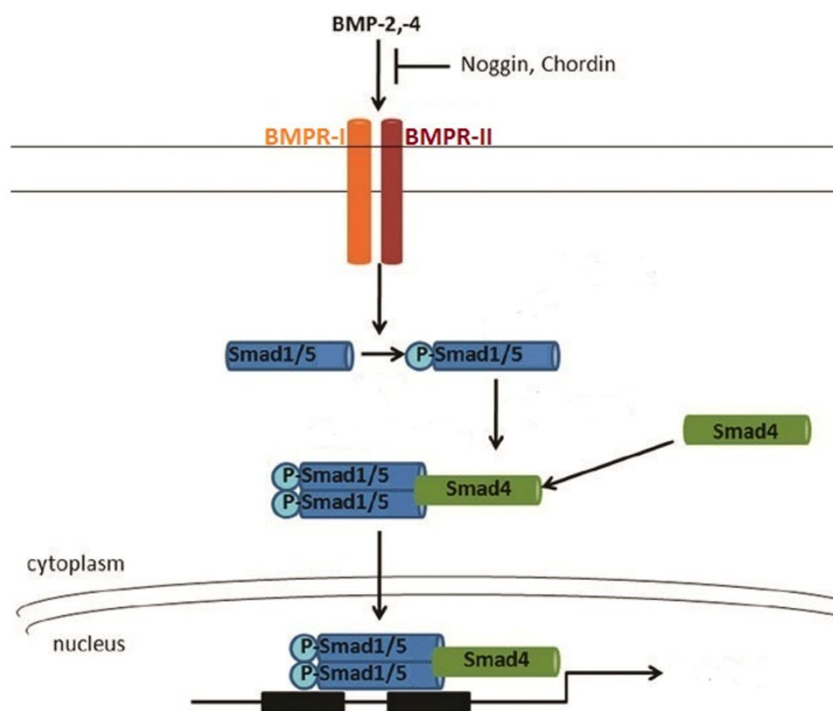
4.1. Notch

Notch je rodina čtyř transmembránových receptorů účastnících se stejnojmenné signální dráhy Notch, která funguje jako nástroj pro komunikaci a signalizaci buněk na krátké vzdálenosti. Tato dráha dále sestává z 5 hlavních Notch ligandů rodin Jagged a Delta a transkripčního faktoru RBPjk (Wang *et al.*, 2015). Jedná se o vysoce konzervovanou dráhu, která má významný vliv při mnoha procesech během embryonálního vývoje i v zachování homeostázy dospělých tkání napříč živočišnou říší. Chyba v této signalizaci se může projevit jako vývojové vady nebo rakovina. V obou oblastech neurogeneze dospělého mozku je funkcí Notch determinace a diferenciaci buněk, konkrétněji starost o stálé udržování populace NSCs v nediferenciovaném stavu (Ehm *et al.*, 2010; Imayoshi *et al.*, 2010). Rozhodnutí mezi neurogenézí nebo udržení poolu NSCs je důležité, a hlavně nezbytné pro možnost generovat nové neurony i do budoucna během života. Při narušení funkce dochází v krátké době k dočasnému nárůstu neurogeneze, hromadné diferenciaci NSCs následováno vyčerpáním celé populace NSCs a dokončeno zánikem neurogeneze (Ehm *et al.*, 2010).

4.2. BMP

BMPs jsou signalizační proteiny, které jsou součástí největší skupiny ligandů transformujících růstových faktorů β (TGF- β) patřících do superrodiny cytokinů. Během embryogeneze se svou aktivitou BMPs podílí mj. na organizaci dorzoventrálního uspořádání neurální trubice. Působení BMP můžeme pozorovat i v neurogenních oblastech dospělého mozku, kde ovlivňuje proliferaci a diferenciaci NSC. V SVZ svou činností inhibuje tvorbu neuroblastů a indukuje diferenciaci NSCs v gliové buňky (Lim *et al.*, 2000). V hipokampální oblasti reguluje rychlost zrání NPC. Při nadměrné expresi dochází k ukončení buněčného cyklu NPC a zpomalení celého procesu zrání (Bond *et al.*, 2014). Negativními regulátory BMP signalizace jsou např. Noggin (Lim *et al.*, 2000), Chordin (Mikawa a Sato, 2013) a Neurogenesis-1 (Ueki *et al.*, 2003), které se na BMP vážou a způsobují inaktivaci. Jak již bylo zmíněno, neurogeneze s přibývajícím věkem slábne. To má nejspíš na svědomí právě BMP signalizace, jejíž aktivita v hipokampu se se stářím stále zvyšuje a zabraňuje tak tvorbě nových neuronů. Zastavení působení BMP vedlo u staré myši k navýšení neurogeneze. Předpokládá se, že tudy by mohla vést cesta pro léčbu s věkem se rozvíjejících kognitivních poruch (Yousef *et al.*, 2015).

Signalizační dráha je zprostředkována skrze dvě třídy ser/thr kinázových receptorů: receptory typu I a typu II (Viz Obr. 3). Aktivní receptor fosforyluje protein SMAD (1; 5; 8), který následně vytváří komplex se SMAD4 a přesunuje se do jádra, zde komplex aktivuje transkripci cílových genů BMP (Mira *et al.*, 2010)



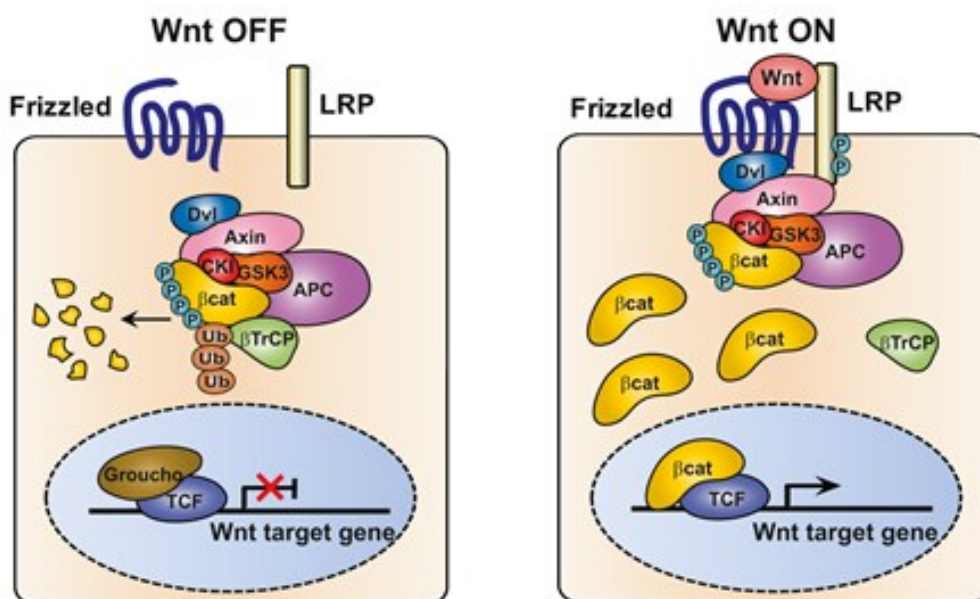
Obr. 3: Schéma popisující BMP signalizační kaskádu

BMP ligand se váže na 2 typy receptorů (BMPR-I a BMPR-II), aktivní receptory fosforylují protein SMAD1/5, který interaguje se SMAD4. Tento komplex vstupuje do jádra, kde dochází k expresi BMP cílových genů. V přítomnosti nogginu, nebo chordinu je celá kaskáda inhibována (upraveno z Vrijens *et al.*, 2013).

4.3. Wnt

Wnt patří do velké rodiny ligandů účinkujících ve Wnt signalizační dráze, pojmenované spojením dvou názvu pro homologní geny objevené u mouchy jako Wingless a u myši jako Integration 1. Wnt signální dráha je velmi významná konzervovaná komplexní dráha, kde Wnt proteiny spouští více signálních kaskád, tou hlavní je kanonická β -katenin dependentní Wnt dráha. Další Wnt dráhy jsou nekanonické na β -kateninu nezávislé a můžeme zde pro příklad zmínit Wnt/ Ca^{2+} dráhu nebo Wnt/PCP dráhu. Wnt proteiny se účastní celé řady procesů důležitých pro vývoj a regulaci centrálního nervového systému. Role kanonické

Wnt dráhy v dospělé neurogenезi byla popsána jak v oblasti hipokampu (Lie *et al.*, 2005), tak v SVZ předního mozku (Yu *et al.*, 2006). Wnt ligand se váže na receptor Frizzled a jeho ko-receptor LRP (z angl. Lipoprotein receptor-related protein) (viz Obr. 4). Tím se spouští signalizační kaskáda, která vede k hromadění β -kateninu v cytoplasmě a jeho průchodu do jádra. Zde aktivuje transkripci Wnt cílových genů navázáním na TCF/LEF transkripční faktory (z angl. T-cell factor/lymphoid enhancer-binding factor) a vyvázáním represoru Groucho (Daniels a Weis, 2005). V nepřítomnosti Wnt ligandu dochází k formování degradačního komplexu, který nedovoluje hromadění β -kateninu. Součástí komplexu je aktivovaný GSK-3 β (Glycogen synthase kinase-3 β), CK1 (Casein kinase 1), protein Axin1 a APC (Adenomatous polyposis coli) a svým působením dochází k fosforylaci β -kateninu. Fosforylovaný β -katenin je rozpoznán E3 ligázou β -TrCP (z angl. β -transducin repeats-containing proteins) a ubikvitinilován. Takto označen je následně velmi rychle degradován v proteazomu. Je-li spuštěna kaskáda, vytvořený komplex Wnt/Frizzled/LRP interaguje s proteinem Dishevelled (Dvl) prostřednictvím Frizzled, tím zablokují působení destrukčního komplexu a umožní hromadění nefosforylovaného β -kateninu (Li *et al.*, 2012).



Obr. 4: Schéma kanonické Wnt signální dráhy

Vlevo: V nepřítomnosti Wnt ligandu dochází k fosforylaci a degradaci β -kateninu pomocí degradačního komplexu a β -TrCP, který β -katenin ubikvitiniluje. **Vpravo:** Wnt ligand se váže na receptory Frizzled a LRP, komplex se váže na Dvl, dochází ke změnám degradačního komplexu, odvázení ligázy β -TrCP. Akumulace β -kateninu v cytosolu dovolí jeho vstup do jádra a aktivaci transkripčního faktoru TCF nahrazením represoru Groucho (upraveno z Li *et al.*, 2012).

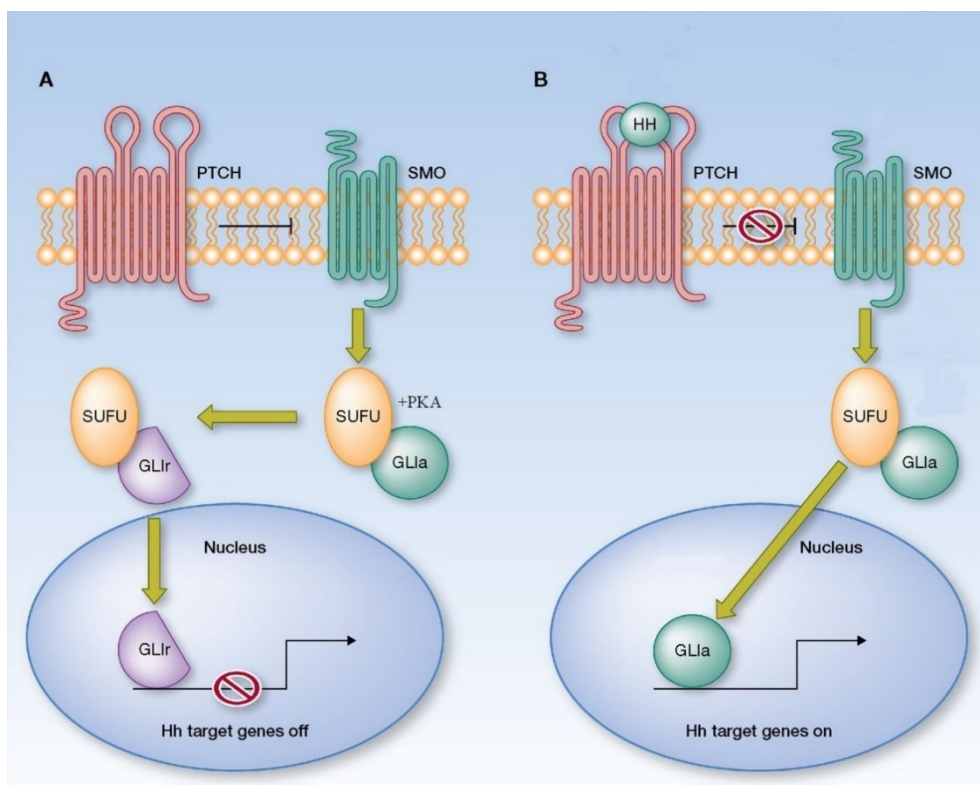
Wnt dráha má široký záběr působení, v dospělé neurogenezi podporuje proliferaci NPCs a vznik nových neuronů. Jako přirozený antagonist působí proti Wnt dráze např. Dickkopf-1 (Dkk1), který je produkován zralými granulárními neurony GD a navazuje se na ko-receptor LRP. Stárnutím se zvyšuje jeho koncentrace v niche, kde blokuje Wnt dráhu a ovlivňuje negativně neurogenezi (Seib *et al.*, 2013). Dalším, granulárními neurony vysoce sekretovaným inhibítorem, je sFRP3 (Frizzled-related protein 3), který svým působením udržuje NSC v klidovém stavu. Neuronální aktivitou lze snížit expresi sFRP3 a podpořit maturaci nových neuronů (Jang *et al.*, 2013).

4.4. Sonic hedgehog

Hedgehog (Hh) rodina je genová rodina kódující skupinu signálních proteinů účastnící se signalizační kaskády, která je velmi konzervovaná a je pozorovatelná napříč různými druhy živočichů od bezobratlých po savce. Vědci Nüsslein-Volhard a Wieschaus studovali tělní plán *Drosophily melanogaster*, díky mutacím našli skupinu genů ovlivňující vývoj těla larvy, mezi nimi mj. geny zodpovědné za anteriorposteriorní polaritu segmentů, kam patří právě Hh geny (Nüsslein-Volhard a Wieschaus, 1980). Mutanti v Hh genu připomínají svými trnitými výběžky ježka, odtud název z anglického Hedgehog. Ukázalo se, že u savců jsou kódovány celkem 3 proteiny z Hh rodiny: Desert hedgehog (Dhh), Indian hedgehog (Ihh) a Sonic hedgehog (Shh) (Echelard *et al.*, 1993). Hedgehog signalizace má ústřední postavení při vývoji embrya, je však důležitá i pro udržování správné tkáňové homeostázy v dospělém jedinci. Nejvíce studovaným a nejvíce významným ligandem je Shh.

Signální buňka exprimuje prekurzor Shh, ten je vzápětí štěpen v peptidické vazbě a vznikají dva odlišné proteiny s odlišnou funkcí. Místo štěpení je velmi konzervované v rámci rodiny Hh a správná funkce obou proteinů je jím vysoce podmíněna. Navíc se ukázalo, že následnou signalizaci zajišťuje pouze menší 18 kDa N-končící protein (Porter *et al.*, 1995). Ten je nadále modifikován připojením dvou lipidových skupin. Na karboxylový konec proteinu je kovalentně napojen cholesterolový zbytek a na N-konci je přidána palmitová skupina (Pepinsky *et al.*, 1998). Modifikace Shh jsou důležité pro vyloučení proteinu z buňky do extracelulárního prostoru. Průchod je zprostředkován přes transmembránový protein Dispatched (Disp) a glykoproteinový extracelulární protein Scube2, kteří oba interagují s cholesterolovým zbytkem Shh (Tukachinsky *et al.*, 2012). Bylo také potvrzeno, že

přítomnost palmitového zbytku zvyšuje rychlost sekrece proteinu a je významný pro další Shh signalizační aktivitu (Creanga *et al.*, 2012). V extracelulárním prostoru se Shh šíří a vytváří koncentrační gradient. Kontaktem a navázáním Shh na transmembránový receptor Patched (Ptch) je tento protein inaktivován a aktivuje se tak celá signální kaskáda v buňce (viz Obr. 5). Ptch v nepřítomnosti Shh inhibuje akumulaci proteinu Smoothened (Smo), což je 7x procházející transmembránový protein z rodiny receptorů spřažených s G-proteiny (GPCR) (McMillan a Matsui, 2012). Zároveň působí v buňce Gpr161 z rodopsinové rodiny GPCR, který zvyšuje bazální hladinu cAMP, čímž se aktivuje protein kináza A (PKA) (Mukhopadhyay *et al.*, 2013). PKA spolu s tumorsupresorovým proteinem SuFu (z angl. Suppressor of fused) jsou hlavními negativními regulátory aktivity Gli rodiny transkripčních faktorů (Gli1, Gli2, Gli3).



Obr. 5: Schéma popisující Hh signalizaci

A) Znárodnění inhibice transkripce cílových genů Hh. Bez Hh ligandu Ptch inhibuje Smo, dochází k represi Gli transkripčních faktorů za pomoci SuFu a PKA. **B)** Znárodnění aktivace exprese cílových genů Hh nasednutím Hh ligandu na Ptch a uvolnění Smo (upraveno z McMillan a Matsui, 2012).

Gli3 zastává v nepřítomnosti Shh roli hlavního supresora cílových genů, zatímco Gli2 pak při Shh stimulu funguje jako aktivátor transkripce Gli1 a ostatních cílových genů. Gli1 je hlavní aktivátor transkripce genů. Aktivace/Represe spočívá ve výměně dvou forem Gli - GliA a GliR. V absenci Smo dochází k fosforylaci a proteolýze, čímž dojde ke zkrácení Gli a vzniká GliR. Při zvýšení koncentrace Smo vzniká správně dlouhá aktivovaná forma GliA, která vstupuje do jádra a aktivuje transkripci cílových genů (Bai *et al.*, 2004; Hui *et al.*, 2011).

4.4.1 Funkce Shh

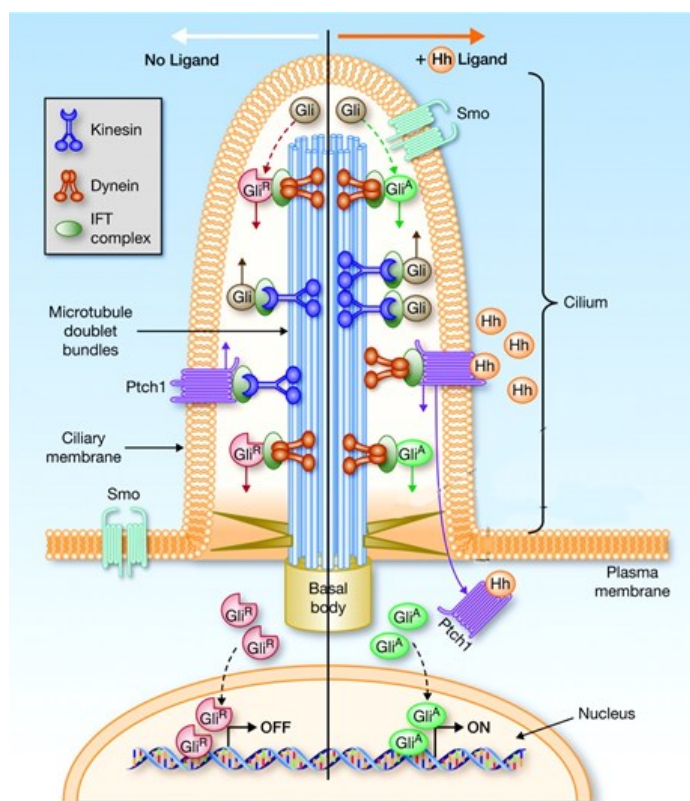
Shh má během embryogeneze výsadní postavení v řadě procesů včetně vývoje nervového systému. Vyskytuje se převážně v notochordu a neurální ploténce, odtud se vytváří Shh gradient a dochází k ventralizaci nervové trubice. Vytváří tak zóny pro vznik odlišných ventrálních progenitorových buněk, které dávají vznik různým typům neuronům. Shh reguluje expresi genů, ty lze rozdělit do dvou tříd. Geny I. třídy jsou potlačovány Shh signalizací a patří zde geny transkripčních faktorů *Pax-*, *Msx-*, *Dbx-* rodin. Druhou skupinou jsou geny II. třídy, které jsou naopak závislé na přítomnosti Shh, a kódují transkripční faktory *Nkx-* rodiny. Na základě rozdílné exprese proteinů jsou následně generovány odlišné typy neuronů (Briscoe a Ericson, 1999) jako např. dopaminergní neurony nebo motoneurony.

V dospělé neurogenезi role Shh aktivně pokračuje a dráha se uplatňuje v obou niche NS buněk. Zde má úlohu v sebeobnovování a specifikaci NSC a NPC (Ahn a Joyner, 2005). V SVZ si Shh ponechává svou roli v dorzoventrálním určení adultních NSCs. Zdrojem Shh ligandu se ukazuje být skupina dospělých ventrálních neuronů předního mozku a dráha je potřebná pro produkci specifických subtypů neuronů čichového bulbu, kdy vyřazením Shh ligandu dochází ke ztrátě specifických granulórních interneuronů (Ihrie *et al.*, 2011). Výzkum Ihrie a jejích kolegů také ukazuje, že exprese Gli1 je u dospělého myšního mozku mnohem vyšší ve ventrální části SVZ než v té dorzální. Nicméně v postnatálním mozku byla exprese Gli1 pozorována i v dorzální části SVZ konkrétněji pod *Corpus Callosum* (CC). Tato dorzální část dočasně reaguje na Shh signalizaci a exprimuje vysoké hladiny Gli1. Produkuje velké množství oligodendroglálních buněk CC, ale také specifické subtypy neuronů čichového bulbu (Tong *et al.*, 2015). Shh je důležitý i pro migraci neuroblastů do čichového bulbu (Balordi a Fishell, 2007). Hipokampální NPCs také exprimují Ptch, Smo a reagují na Shh signalizaci, při inhibici dráhy např. cyklopaminem dochází ke snížení proliferace progenitorových buněk hipokampu (Lai *et al.*, 2003). Další funkcí aktivní Shh dráhy je

prodlužování axonů hipokampálních neuronů. Signál není přijímán přímo axony, ale šíří se ze somatodendritické oblasti neuronů (Yao *et al.*, 2015). Neurální aktivitou nebo poraněním hlavy lze skrze Shh signalizaci zvýšit hipokampální neurogenezi. Regulací růstu axonů a tvorbou nových synapsí se vytváří v průběhu života hipokampální neuroplasticita.

4.4.2 Shh signalizace a primární cilium

Ukázalo se, že klíčovou organelou, ve které probíhá Shh signalizace, je primární cilium. Tato do nedávna opomíjená organela obsahuje všechny důležité komponenty Shh kaskády a je s ní úzce spojena, bez ní dráha nemůže být aktivována. Základem cilia je mikrotubulární struktura, díky které je umožněn intraflagelární transport (IFT). Tento proces zahrnuje 2 směry transportu, retrográdní a anterográdní (viz Obr. 6). V nepřítomnosti Shh ligandu je Ptch umístěn v membráně cilia a brání akumulaci Smo, navázáním Shh ligandu je Ptch transportováno směrem do buňky tzn. pryč z cilia a tím dovoluje přesun Smo do cilia (Rohatgi *et al.*, 2007).



Obr. 6: Role primárního cilia v Shh signalizaci: Primární cilium je tvořeno bazálním tělískem, ze kterého vystupují mikrotubulové svazky obalené ciliární membránou. Kinezy vedou náklad směrem k vrcholu cilia, dyneiny směřují opačným směrem. **Vlevo od středu:** Uspořádání komponent Shh kaskády v primárním ciliu bez přítomnosti ligandu. Ptch1 lokalizován v ciliu brání koncentraci Smo, který je držen mimo cilium. Dochází k přesunu Gli ke špičce cilia a jeho upravení na neaktivní GliR formu, která brání transkripci genů. **Vpravo od středu:** Hh ligand se váže na Ptch1, čímž je transportován z cilia a Smo se může přesunout do ciliární

membrány. Ve špičce dochází k aktivaci Gli na GliA formu, která v jádře nastartuje transkripci cílových genů (upraveno z Hassounah *et al.*, 2012).

Na vrcholu cilia jsou lokalizovány Gli proteiny, resp. Gli2 a Gli3, a SuFu, přítomný je zároveň KIF7 (z angl. kinesin-4 family protein), který je regulátorem délky a stavby cilia, čímž se také podílí na regulaci Shh signalizace. Absencí KIF7 dochází k tvorbě cilií různých délek a umístění Gli proteinů a SuFu i mimo vrchol cilia, což způsobuje chybnou aktivaci dráhy i bez přítomnosti Shh ligandu (He *et al.*, 2014). Primární cilium je tvořeno řadou IFT proteinů, které jsou pro jeho vznik a fungování naprosto nepostradatelné. Poprvé bylo spojení mezi primárním ciliem a aktivací Shh dráhy pozorováno za pomoci indukované mutace v genech *wimple* a *flexo*. Mutace poškodily IFT proteiny, což se dále projevilo narušením správného průběhu Shh signalizace a myší mutanti pak postrádali ventrální typy nervových buněk (Huangfu *et al.*, 2003). Strukturní i funkční poruchy primárního cilia vedou k celé řadě defektů a jsou souhrnně nazývány ciliopathiemi. Cilium v závislosti na okolnostech může působit jako supresor i aktivátor Shh signalizace, což může hrát roli při tumorigenezi (Wong *et al.*, 2009).

4.4.3 Shh signalizace a tumorigeneze

Shh dráha je důležitým regulátorem buněčného růstu a diferenciaci. Je tedy zřejmé, že nadměrná aktivace Shh může mít negativní důsledky na buňky, obzvláště u NSCs, které jsou převážně po většinu času v klidovém stavu. Chyba v signální kaskádě může vést ke vzniku nádorů jako např. maligních gliomů a meduloblastomů. Často u nádorů mozku se během léčby vyvine rezistence vůči chemoterapeutikům nebo se složitěji léčí. Úspěšnost léčby je relativně nižší než u jiných typů nádorů. Na vzniku nádorů se může podílet i více signálních drah zároveň. Vědci se snaží zacílit na komponenty Shh signalizace v naději, že objeví nový terapeutický nástroj na léčbu tumorů nejen v mozku. Mezi zkoumané molekuly jsou také Smo a Gli proteiny, jejichž inhibicí se dá regulovat Shh dráha. Potenciálním inhibátorem je např. již zmíněný cyklopamin, který se váže na Smo a zastavuje proliferaci (Taipale *et al.*, 2000). Inhibicí Gli1 by se mohla zmírnit multidrogová rezistence (Cui *et al.*, 2009). Bylo dále zjištěno, že vyřazením Gpr161 během embryogeneze dojde ke zvýšení výskytu nádorů a při jeho nízké expresi byla pozorována snížená úspěšnost léčby pacientů majících meduloblastoma (Shimada *et al.*, 2018).

5. Závěr

Neurogeneze je stále aktuální téma, které doposud nebylo ani zdaleka vyčerpáno. I když se jí vědci věnují již více než 50 let, stále zůstává spousta otázek nezodpovězena. V dospělém mozku savců se neurogeneze vyskytuje převážně ve dvou oblastech a má významný dopad na neurální plasticitu mozku. I přes veškeré snahy charakterizovat heterogenní populaci NSC, je velmi těžké sledovat a odlišit všechny etapy diferenciací NSC. Navíc je většina pozorování prováděna na myších modelech a ačkoli sdílí určité podobnosti, lidská neurogeneze se v některých bodech od té hlodavčí liší. Pro praktické použití bude potřeba více studií prováděných na lidech a zřejmě i vývoj nových metod. Charakter NSC je významně určován mikroprostředím, ve kterém se tyto buňky nacházejí. Proto má smysl se věnovat pochopení signálních drah a jejich molekul, které se na neurogenезi zásadním způsobem podílejí. Jejich působení reguluje všechny podstatné fáze vzniku nových neuronů a jsou nezbytné pro udržování tkáňové homeostázy. Signální kaskády se vzájemně mohou křížit a regulovat, což přidává na dynamičnosti celé neurogenезi. Význam kaskád lze navíc pozorovat i během tumorigenезe. Poškození drah, které je často spojováno se vznikem nádorů a nalezením inhibitorů drah, by tedy mohlo přinést další terapeutický nástroj pro léčbu. Navíc je aktivita některých drah spojena se stářím, kdy s přibývajícím věkem dochází ke zvýšené signalizaci ligandů a úpadku neurogenезe, což se projevuje kognitivními poruchami a špatnou pamětí. Shromáždění co nejvíce informací o neurogenезi by mohlo do budoucna ovlivnit průběh řady neurodegenerativních onemocnění nebo dokonce otevřít nové možnosti poskytnutí léčby.

Seznam použité literatury

Ahn S., Joyner A. L. 2005. In vivo analysis of quiescent adult neural stem cells responding to Sonic hedgehog. *Nature* 437, 894-897

Altman J. 1969. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *Journal of Comparative Neurology* 137, 433-458.

Altman J., Das G. D. 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *Journal of Comparative Neurology* 124, 319-335.

Bai C. B., Stephen D., Joyne A. L. 2004. All Mouse Ventral Spinal Cord Patterning by Hedgehog Is Gli Dependent and Involves an Activator Function of Gli3. *Developmental Cell* 6, 103-115

Balordi F., Fishell G. 2007. Hedgehog Signaling in the Subventricular Zone Is Required for both the Maintenance of Stem Cells and the Migration of Newborn Neurons. *The Journal of Neuroscience* 27, 5936-5947

Beckmann J., Scheitza S., Wernet P., Fischer J. C., Giebe B. 2007. Asymmetric cell division within the human hematopoietic stem and progenitor cell compartment: identification of asymmetrically segregating proteins. *Blood* 109, 5494-5501

Bergmann O., Liebl J., Bernard S., Alkass K., Yeung M. S. Y., Steier P., Kutschera W., Johnson L., Landén M., Druid H., Spalding K. L., Frisén J. 2012. The Age of Olfactory Bulb Neurons in Humans. *Neuron* 74, 634-639

Bodnar A. G., Ouellette M., Frolkis M., Holt S. E., Chiu Ch., Morin G. B., Harley C. B., S. J. W., Lichtsteiner S., Wrigh W. E. 1998. Extension of Life-Span by Introduction of Telomerase into Normal Human Cells. *Science* 279, 349-352

Bond A. M., Peng Ch.-Y., Meyers E. A., McGuire T., Ewaleifoh O., Kessler J. A. 2014. BMP Signaling Regulates the Tempo of Adult Hippocampal Progenitor Maturation at Multiple Stages of the Lineage. *Stem Cells* 32, 2201-2214

Briscoe J., Ericson J. 1999. The specification of neuronal identity by graded sonic hedgehog signalling. *Cell & Developmental Biology* 10, 353-362

- Campbell J. G., Miller D. C., Cundiff D. D., Feng Q., Litofsky N. S.** 2015. Neural stem/progenitor cells react to non-gliial cns neoplasms. *SpringerPlus* 4 (53), 1-8
- Christian K. M., Song H., Ming G. L.** 2014. Functions and Dysfunctions of Adult Hippocampal Neurogenesis. *Annual Review of Neuroscience* 37, 243-262
- Creanga A., Glenn T. D., Mann R. K., Saunders A. M., Talbot W. S., Beachy P. A.** 2012. Scube/You activity mediates release of dually lipid-modified Hedgehog signal in soluble form. *Genes Development* 26, 1312-1325
- Cui D., Xu Q., Wang K., Che X.** 2009. Gli1 is a potential target for alleviating multidrug resistance of gliomas. *Journal of the neurological science* 288, 156-166
- Daniels D. L., Weis W. I.** 2005. β -catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nature Structural & Molecular Biology* 12, 364-371
- Dias G. P., Cavegn N., Nix A., Bevilaqua do Nascimento M. C., Stangl D., Zainuddin M. S. A., Nardi A. E., Gardino P. F., Thuret S.** 2012. The Role of Dietary Polyphenols on Adult Hippocampal Neurogenesis: Molecular Mechanisms and Behavioural Effects on Depression and Anxiety. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2012, 1-18
- Doetsch F., Caille I., Lim D. A., Garcia-Verdugo J. M., Alvarez-Buylla A.** 1999. Subventricular Zone Astrocytes Are Neural Stem Cells in the Adult Mammalian Brain. *Cell* 97, 703-716
- Echelard Y., Epstein D. J., St-Jacques J: B., Shen L., Mohler J., McMahon J. A., McMahon A. P.** 1993. Sonic Hedgehog, a Member of a Family of Putative Signaling Molecules, Is Implicated in the Regulation of CNS Polarity. *Cell* 75, 1417-1430
- Ehm O., Göritz Ch., Covic M., Schäffner I., Schwarz T. J., Karaca E., Kempkes B., Kremmer E., Pfrieger F. W., Espinosa L., Bigas A., Giachino C., Taylor V., Frisén J., Lie D. Ch.** 2010. RBPJk-Dependent Signaling Is Essential for Long-Term Maintenance of Neural Stem Cells in the Adult Hippocampus. *The Journal of Neuroscience* 30 (41), 13794-13807

- Eriksson P. S., Perfilieva E., Björk-Eriksson T., Alborn A., Nordborg C., Peterson D. A., Gage F. H.** 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Medicine* 4, 1313-1317
- Ernst A., Alkass K., Bernard S., Salehpour M., Perl S., Tisdale J., Possnert G., Druid H., Frisén J.** 2014. Neurogenesis in the Striatum of the Adult Human Brain. *Cell* 156, 1072-1083
- Evans M. J., Kaufman M. H.** 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156
- Fuccillo M., Joyner A. L., Fishell G.** 2006. Morphogen to mitogen: the multiple roles of hedgehog signalling in vertebrate neural development. *Nature Reviews Neuroscience* 7 (10), 772-783
- Goncalves J. T., Schafer S. T., Gage F. H.** 2016. Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. *Cell* 167, 897-914
- Hanna J., Wernig M., Markoulaki S., Sun C., Meissner A., Cassady J. P., Beard C. Brambrink T., Wu L., Townes T. M., Jaenisch R.** 2007. Treatment of Sickle Cell Anemia Mouse Model with iPS Cells Generated from Autologous Skin. *Science* 318, 1920-1923
- Hassounah N. B., Bunch T. A., McDermott K. M.** 2012. Molecular Pathways: The Role of Primary Cilia in Cancer Progression and Therapeutics with a Focus on Hedgehog Signaling. *Clinical Cancer Research* 18 (9), 2429-2435
- He M., Subramanian R., Bangs F., Omelchenko T., Liem K. F. Jr., Kapoor T. M., Anderson K. V.** 2014. The Kinesin-4 Protein KIF7 Regulates Mammalian Hedgehog Signaling by Organizing the Cilia Tip Compartment. *Nature cell biology* 16, 663-672
- Huangfu D., Liu A., Rakeman A. S., Murcia N. S., Niswander L., Anderson K. V.** 2003. Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature* 426, 83-87
- Hui CC., Angers S.** 2011. Gli Proteins in Development and Disease. *The Annual Review of Cell and Developmental* 27, 513-537
- Ihrie R. A., Shah J. K., Harwell C. C., Levine J. H., Guinto Ch. D., Lezameta M., Kriegstein A. R., Alvarez-Buylla A.** 2011. Persistent Sonic Hedgehog Signaling in Adult Brain Determines Neural Stem Cell Positional Identity. *Neuron* 71, 250-262

- Imayoshi I., Sakamoto M., Yamaguchi M., Mori K., Kageyama R.** 2010. Essential Roles of Notch Signaling in Maintenance of Neural Stem Cells in Developing and Adult Brains. *The Journal of Neuroscience* 30 (9), 3489-3498
- Jang M-H., Bonaguidi M. A., Kitabatake Y., Sun J., Song J., Kang E., Jun H., Zhong Ch., Su Y., Guo J. U., Wang M. X., Sailor K. A., Kim J-Y., Gao Y., Christian K. M., Ming G., Song H.** 2013. Secreted Frizzled-Related Protein 3 Regulates Activity-Dependent Adult Hippocampal Neurogenesis. *Cell Stem Cell* 12, 215-223
- Kawase S., Kuwako K., Imai T., Renault-Mihara F., Yaguchi K., Itohara S., Okano H.** 2014. Regulatory factor X transcription factors control Musashi1 transcription in mouse neural stem/progenitor cells. *Stem Cells and Development* 23 (18), 2250-2261
- Lai K., Kaspar B. K., Gage F. H., Schaffer D. V.** 2003. Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nature neuroscience* 6, 21-27
- Li V. S. W., Ng S. S., Boersema P. J., Low T. Y., Karthaus W. R., Gerlach J. P., Mohammed S., Heck A. J. R., Maurice M. M., Mahmoudi T., Clevers H.** 2012. Wnt Signaling through Inhibition of b-Catenin Degradation in an Intact Axin1 Complex. *Cell* 49, 1245-1256
- Lie D.-C., Colamarino S. A., Song H.-J., Désiré J., Mira H., Consiglio A., Lein E.S., Jessberger S., Lansford H., Dearie A. R., Gage F. H.** 2005. Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature* 437, 1370-1375
- Lim D. A., Tramontin A. T., Trevejo J. M., Herrera D. G., García-Verdugo J. M., Alvarez-Buylla A.** 2000. Noggin Antagonizes BMP Signaling to Create a Niche for Adult Neurogenesis. *Neuron* 28, 713-726
- Ma H., Yang Y., Ma M.** 2012. Totipotent of Stem Cell. *Stem Cell* 3 (4), 1545-4570
- Martin G.R.** 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 78 (12), 7634-7638
- McMillan R., Matsui W.** 2012. Molecular Pathways: The Hedgehog Signaling Pathway in Cancer. *Clinical Cancer Research* 18, 4883-4888

- Menn B., Garcia-Verdugo J. M., Yaschine C., Gonzalez-Perez O., Rowitch D., Alvarez-Buylla A.** 2006. Origin of Oligodendrocytes in the Subventricular Zone of the Adult Brain. *The Journal of Neuroscience* 26 (30), 7907-7918
- Mikawa S., Sato K.** 2014. Chordin expression in the adult rat brain. *Neuroscience* 258, 16-33
- Mira H, Andreu Z., Suh H., Lie D. Ch., Jessberger S., Consiglio A., Emeterio J. S., Hortigüela R., Marqués-Torrejón M. A., Nakashima K., Colak D., Götz M., Farinas I., Gage F. H.** 2010. Signaling through BMPR-IA Regulates Quiescence and Long-Term Activity of Neural Stem Cells in the Adult Hippocampus. *Cell Stem Cell* 7, 78-89
- Mukhopadhyay S., Wen X., Ratti N., Loktev A., Rangell L., Scales S. J., Jackson P. K.** 2013. The Ciliary G-Protein-Coupled Receptor Gpr161 Negatively Regulates the Sonic Hedgehog Pathway via cAMP Signaling. *Cell* 152, 210–223
- Nüsslein-Volhard Ch., Wieschaus E.** 1980. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795-801
- Pepinsky R. B., Zeng C., Wen D., Rayhorn P., Baker D. P., Williams K. P., Bixler S. A., Ambrose Ch. M., Garber E. A., Miatkowski K., Taylor F. R., Wang E. A., Galdes A.** 1998. Identification of a Palmitic Acid-modified Form of Human Sonic hedgehog. *The journal of Biological Chemistry* 273, 14037-14045
- Phinney D. G., Prockop D. J.** 2007. Mesenchymal Stem/Multipotent Stromal Cells: The State of Transdifferentiation and Modes of Tissue Repair - Current Views. *Stem cell* 25, 2896-2902
- Porter J. A., von Kessler D. P., Ekker S. C., Young K. E., Lee J. J., Moses K., Beachy P. A.** 1995. The product of hedgehog autoproteolytic cleavage active in local and long-range signalling. *Nature* 374, 363-366
- Rohatgi R., Milenkovic L., Scott M. P.,** 2007. Patched1 Regulates Hedgehog Signaling at the Primary Cilium. *Science* 317, 372-376
- Sahay A., Wilson D. A., Hen R.** 2011. Pattern Separation: A Common Function for New Neurons in Hippocampus and Olfactory Bulb. *Neuron* 70, 582-588

Secco M., Zucconi E., Vieira N. M., Fogaca L. L.Q., Cerqueira A., Carvalho M. D. F., Jazedje T., Okamoto O. K., Muotri A. R., Zatz M. 2008. Multipotent Stem Cells from Umbilical Cord: Cord Is Richer than Blood! *Stem Cells* 26, 146-150

Seib D. R. M., Corsini N. S., Ellwanger K., Plaas Ch., Mateos A., Pitzer C., Niehrs Ch., Celike T., Martin-Villalba A., 2013. Loss of Dickkopf-1 Restores Neurogenesis in Old Age and Counteracts Cognitive Decline. *Cell Stem cell* 12, 204-214

Seri B., García-Verdugo J. M., McEwen B. S., Alvarez-Buylla A. 2001. Astrocytes Give Rise to New Neurons in the Adult Mammalian Hippocampus. *The Journal of Neuroscience* 21 (18), 7153–7160

Shimada I. S., Hwang S – H., Somatilaka B. N., Wang X., Skowron P., Kim J., Kim M., Shelton J. M., Veena R., Xuan Z., Taylor M. D., Mukhopadhy S. 2018. Basal Suppression of the Sonic Hedgehog Pathway by the G-Protein-Coupled Receptor Gpr161 Restricts Medulloblastoma Pathogenesis. *Cell Reporst* 22, 1169-1184

Shin J., Berg D. A., Zhu Y., Shin J. Y., Song J., Bonaguidi M. A., Enikolopov G., Nauen D. W., Christian K. M., Ming G., Song H. 2015. Single-Cell RNA-Seq with Waterfall Reveals Molecular Cascades underlying Adult Neurogenesis. *Cell Stem Cell* 17, 360-372

Spalding K. L., Bergmann O., Alkass K., Bernard S., Salehpour M., Huttner H. B., Bostrom E., Westerlund I., Vial C., Buchholz B. A., Possnert G., Mash D. C., Druid H., Frisén J. 2011. Dynamics of Hippocampal Neurogenesis in Adult Humans. *Cell* 153, 1219-1227

Taipale J., Chen J. K., Cooper M. K., Wang B., Mann R. K., Milenkovic L, Scott M. P., Beachy P. A. 2000. Effects of oncogenic mutations in Smoothed and Patched can be reversed by cyclopamine. *Nature* 31, 1005-1009.

Takahashi K., Yamanaka S. 2006. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126 (4), 663-676

Taupin P., Gage F. H., 2002. Adult Neurogenesis and Neural Stem Cells of the Central Nervous System in Mammals. *Journal of Neuroscience Research* 69, 745-749

Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S. S., Waknitz M. A., Swiergiel J. J., Marshall V. S., Jones J. M. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147

Tong Ch. K., Fuentealba L. C., Shah J. K., Lindquist R. A., Ihrie R. A., Guinto Ch. D., Rodas-Rodriguez J. L., Alvarez-Buylla A. 2015. Dorsal SHH-Dependent Domain in the V-SVZ Produces Large Numbers of Oligodendroglial Lineage Cells in the Postnatal Brain. *Stem Cell Reports* 5, 461-470

Tsuji O., Miura K., Okada Y., Fujiyoshi K., Mukaino M., Nagoshia N., Kitamura K., Kumagaia G., Nishino M., Tomisato S., Higashi H., Nagai T., Katoha H., Kohda K., Matsuzaki Y., Yuzaki M., Ikeda E., Toyama Y., Nakamura M., Yamanaka S, and Okano H. 2010. Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. *PNAS* 107, 12704-12709

Tukachinsky H., Kuzmickas R. P., Jao C. Y., Liu J., Salic A. 2012. Dispatched and Scube Mediate the Efficient Secretion of the Cholesterol-Modified Hedgehog Ligand. *Cell Reports* 2, 308-320

Ueki T., Tanaka M., Yamashita K., Mikawa S., Qiu Z., Maragakis N. J., Hevner R. F., Miura N., Sugimura H., Sato K. 2003. A novel secretory factor, Neurogenesis-1, provides neurogenic environmental cues for neural stem cells in the adult hippocampus. *Journal of Neuroscience* 23, 11732-11740

Venere M., Han Y. G., Bell R., Song J. S., Alvarez-Buylla A., Belloch R. 2012. Sox1 marks an activated neural stem/progenitor cell in the hippocampus. *Development* 139 (21), 3938-3949

Vrijens K., Lin W., Cui J., Farmer D., Low J., Pronier E., Zeng F.-Y., Shelat A. A., Guy K., Taylor M. R., Chen T., Roussel M. F. 2013. Identification of Small Molecule Activators of BMP Signaling. *Plos one* 8, 1-10

Wang H., Zang Ch., Liu X. S., Aster J. C. 2015. The Role of Notch Receptors in Transcriptional Regulation. *J Cell Physiol* 230 (5), 982-988

Wong S. Y., Seol A. D., So P-L., Ermilov A. N., Bichakjian Ch. K., Epstein E. H. Jr, Dlugosz A. A., Reiter J. F. 2009. Primary cilia can both mediate and suppress Hedgehog pathway–dependent tumorigenesis. *Nature Medicine* 15, 1055-1061

Yao P. J., Petralia R. S., Ott C., Wang Y-X., Lippincott-Schwartz J., Mattson M. P. 2015. Dendrosomatic Sonic Hedgehog Signaling in Hippocampal Neurons Regulates Axon Elongation. *Journal of neuroscience* 35 (49), 16126-16141

Yousef H., Morgenthaler A., Schlesinger Ch., Bugaj L., Conboy I. M., Schaffer D. V. 2015. Age-Associated Increase in BMP Signaling Inhibits Hippocampal Neurogenesis. *Stem Cells* 33, 1577-1588

Yu J. M., Kim J. H., Song G. S., Jung J. S. 2006. Increase in proliferation and differentiation of neural progenitor cells isolated from postnatal and adult mice brain by Wnt-3a and Wnt-5a. *Molecular and Cellular Biochemistry* 288, 17-28.

Zuk P. A., Zhu M., Ashjian P., DeUgarte D. A., Huang J. I., Mizuno H., Alfonso Z. C., Fraser J. K., Benhaim P., Hedrick M. H. 2002. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Molecular Biology of the Cell* 13, 4279-4295